Über das
Flügelpigment der Pieriden.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Philosophischen Fakultät (Sektion II)
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt im Oktober 1928
von
Margarete Bülow
aus Anklam / Pommern.

München

Druck der Salesianischen Offizin.

Über das
Flügelpigment der Pieriden.

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde der
Hohen Philosophischen Fakultät (Sektion II)
der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt im Oktober 1928
von
Margarete Bülow
aus Anklam / Pommern.

München

Druck der Salesianischen Offizin.

Berichterstatter: Geh. Rat Prof. Dr. H. Wieland.
Tag der mündlichen Prüfung: 31. Oktober 1928.

BIBLIOTHEEK RIJKS UNIV LEIDEN

Meinen lieben Eltern!

Vorliegende Arbeit wurde im Chemischen Laboratorium der Bayerischen Akademie der Wissenschaften zu München ausgeführt.

Es sei mir gestattet, meinen hochverehrten Lehrern, Herrn Geheimrat Professor Dr. H. Wieland, auf dessen Veranlassung und unter dessen gütiger Leitung diese Arbeit entstanden ist, und Herrn Privatdozenten Dr. C. Schöpf, der mir jederzeit mit Rat und Hilfe freundlichst zur Seite stand, für ihre liebenswürdige Förderung und Unterstützung meinen aufrichtigsten Dank auszusprechen.

Über das Flügelpigment der Pieriden.

Auf dem Gebiet der Schmetterlingsfarbstoffe herrscht bis heute noch wenig Klarheit. Vielfach führt man die Flügelfarben auf rein physikalische Ursachen zurück. Interferenz der Lichtstrahlen an den Flügelschuppen wird für das farbige Schillern, diffuse Reflexion für eine weiße Farbe verantwortlich gemacht. Die Struktur der Schuppe soll das maßgebende sein. Was an chemischen Farbstoffen isoliert wurde, ist nur wenig. Meist gelang auch das Einordnen in eine bestimmte Gruppe nicht. Lange Zeit waren die einzig positiven Ergebnisse die von Hopkins, der aus Gonepterix rhamni einen gelben[1] und bald darauf aus den Pieriden einen weißen Farbstoff[2] isolierte, die er beide als zur Puringruppe gehörig erkannte. Das weiße Flügelpigment spricht er direkt als Harnsäure an. Er löste es mit Ammoniak oder Soda aus den Flügeln, fällte mit Salzsäure und reinigte das erhaltene Produkt durch nochmaliges Umfällen unter Zusatz von Tierkohle.[3] Das so hergestellte Präparat gab in charakteristischer Weise die Murexidreaktion, die Analysen stimmten ziemlich gut auf Harnsäure. Das Chitingefüge der Flügel blieb bei dieser Methode vollkommen erhalten, so daß der Einwand der Gräfin Linden,[4] daß die Harnsäure aus der Flügelsubstanz selbst stammen könnte, unbegründet ist.

Im Jahre 1925 haben Wieland und Schöpf über die Isolierung des gelben Farbstoffes des Zitronenfalters (Gonepterix rhamni) berichtet.[5] Sie bestätigen Hopkins Angaben, daß es sich um ein Purinderivat handele, das mit Salpetersäure Murexid gibt. Der Farbstoff ist amphoter und steht in seinen Reaktionen dem Xanthin sehr nahe. Daß er nicht Xanthin selbst ist, geht unter anderem aus der Analyse hervor, die auf einen Xanthinrest einen Wasserstoff mehr angibt und, da man

[1] Hopkins, Chem. N. 60, 57 (1889) — Nature 40, 335 (1889); 45, 197 581 (1891 bis 1892).

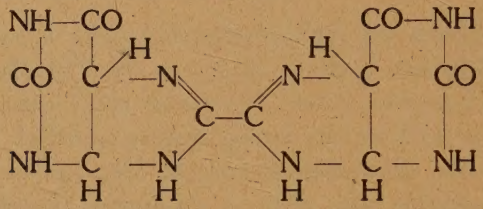
[2] Proc. of the Royal Soc. 57, 5 (1894/95).

[3] Hopkins, Phil. Trans. Roy. Soc. (B) 186, 661 (1895).

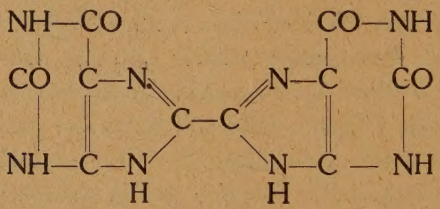
[4] Arch. f. d. ges. Physiologie 98, 7 (1803).

[5] Wieland, Schöpf B. 58, 2178 (1925).

die Formulierung als freies Radikal vermeiden wollte, zur Verdoppelung der Xanthinformel führte. Die Verfasser geben diesem Dihydroxanthin der Summenformel $(C_5H_5O_2N_4)_2$ den Namen Xanthopterin und stellen eine symmetrische Formel:



zur Diskussion. Einige Stütze für diese Auffassung konnte durch die Synthese erbracht werden.[6] Sie führte zwar nicht ganz zum Ziel, aber doch zu einem Dipurinkörper der Zusammensetzung:



der sich zwar nicht zum Xanthopterin hydrieren ließ, aber in seinen Eigenschaften schon stark daran erinnerte.

Im Anschluß an diese Arbeiten wurde die Untersuchung des weißen Flügelpigments der Pieriden, die seit Hopkins geruht hatte, aufgenommen.

Isolierung und orientierende Versuche.

Es kamen zur Verarbeitung nach einander die Flügel der drei Pieriden Pieris napi, Pieris rapae und Pieris brassicae. Die isolierten Pigmente unterschieden sich weder in Analyse, Kristallform oder Reaktionen, so daß man sie wohl als identisch ansehen kann.

Die Isolierung wurde nach Hopkins Methode durchgeführt. Mehrmalige Extraktion mit halbnormalem Ammoniak war nötig, um den Farbstoff aus den Flügeln herauszulösen. Nach dem Eindampfen der

[6] Dissertation Stober, München 1928.

Auszüge bleibt das Ammonsalz als graubraunes, schwer filtrierbares Pulver zurück, das durch Lösen in Natronlauge und Ausfällen durch Salzsäure in die freie Säure übergeführt werden kann. Die Mutterlaugen bleiben rotbraun gefärbt zurück.

Die Reaktionen der so isolierten Substanz sind im allgemeinen denen der Harnsäure ungemein ähnlich. Sie gibt die Murexidreaktion, Blaufärbung mit Phosphorwolframsäurelösung, löst sich etwa in denselben Solventien wie Harnsäure, die Kristallform zeigt bei näherer kristallographischer Untersuchung keinen Unterschied. Der Natronlaugeverbrauch bei der Titration bis zum Umschlagspunkt von Phenolphthalein ist der gleiche.

Bei näherem Zuschauen fielen aber schon früh einige Verschiedenheiten auf.

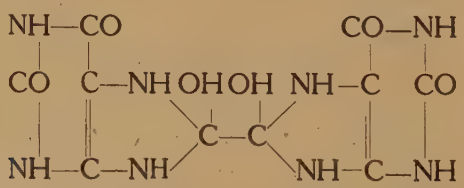
Der genaue Vergleich der Murexidreaktion von Harnsäure und dem gereinigten Präparat zeigte, daß Harnsäure beim Erwärmen mit Salpetersäure (1 Vol. Säure d 1,4 + 3 Vol. Wasser) sehr rasch unter Gasentwicklung reagiert, der Flügelfarbstoff aber nur langsam angegriffen wird. In beiden Fällen erfolgt völlige Lösung. Während aber bei Harnsäure ein durchsichtiger Lack zurückbleibt, besteht der Rückstand des Flügelpigments zu einem großen Teil aus einer gelben körnigen Masse. Die Phosphorwolframsäurereaktion,[7] die auf einer Überführung der Phosphorwolframsäure in eine blaue Reduktionsstufe des Wolframs durch Harnsäure in alkalischer Lösung beruht, tritt auch beim Flügelfarbstoff immer auf, jedoch sehr viel geringer, wenn man mit Präparaten arbeitet, die weitgehendst gereinigt sind, und bei denen Eigenfärbung der Sodalösung keine größere Farbintensität vortäuscht. Die Färbung betrug etwa 20 % der von derselben Menge Harnsäure verursachten. Dieselbe stärkere Reduktionswirkung der Harnsäure zeigte sich gegenüber Silbernitratlösung.[8] Läßt man in die soda-alkalische Harnsäurelösung verdünnte Silbernitrinlösung tropfen, so scheidet sich augenblicklich unter tiefer Schwärzung metallisches Silber aus. Das scheint auch bei unreinen Präparaten des Flügelpigments zu geschehen, doch können hier Nebenreaktionen schuld

[7] Folin und Denis Journ. Biol. Chem. 12, 239 (1912), C. 1912 II 1239. — Folin und Macallum ebenda 13, 363 (1912), C. 1913 I 852.

[8] Schiff A. 109, 67 (1859).

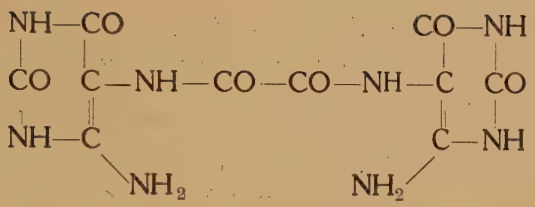
sein. Die reinsten Präparate zeigen keinerlei Reduktionswirkung mehr. Es fällt mit Silbernitrat ein hellgelbes Silbersalz aus, das, in der Lösung suspendiert, stundenlang erhalten bleibt. — Die Löslichkeit des Flügelfarbstoffes ist im allgemeinen geringer als die der Harnsäure. 50 %iges Pyridin löst eine gewisse Menge Harnsäure glatt in der Siedehitze,[9] den Flügelfarbstoff aber nicht merklich. Beim Umfällen aus konzentrierter Schwefelsäure kommt Harnsäure nur langsam in schönen Kristallen wieder, der Flügelfarbstoff dagegen sofort undeutlich kristallisiert. Siedende Kaliumkarbonatlösung oder Kalilauge löst Harnsäure mehr als zehnmal so leicht. Aus Sodalösung erhält man von Harnsäure ein weißes primäres Natriumsalz, aus dem Flügelfarbstoff einen zitronengelben Körper, der nur die Hälfte des Natriums vom primären Natriumurat enthält.

Die Analysen endlich ergaben in voller Übereinstimmung den deutlichsten Unterschied. Und zwar liegen die Verhältnisse hier ähnlich, wie Wieland und Schöpf sie fürs Xanthopterin festlegten. Wieder ist ein Wasserstoffatom mehr vorhanden, als einer einfachen Purinformel entsprechen würde, so daß Flügelfarbstoff und Harnsäure sich gegenüberstehen wie Xanthopterin und Xanthin. Es liegt also nahe, auch hier die Formel zu verdoppeln und das Flügelpigment als Dihydroharnsäure zu charakterisieren gemäß der Formel $(C_5H_5O_3N_4)_2$. Ein neuer Name „Leukopterin" analog dem Xanthopterin der Zitronenfalter ist berechtigt. Der außerordentlichen Ähnlichkeit mit der Harnsäure wegen ist es verlockend, dem Leukopterin eine symmetrische Form und zwar:



zuzuerteilen, wobei es noch fraglich bleibt, ob man dieser geschlossenen oder einer offenen Formulierung:

[9] C. 1918, I 49. — Dehn, Journ. Americ. Chem. Soc. 39, 1399 (1917).



den Vorzug geben will.

Reaktionen der Hydroxyl-Gruppe.

Nimmt man die geschlossene Formel des Leukopterins als richtig an, so ist es natürlich zuerst nach Reaktionen der Hydroxyl-Gruppe zu suchen. In dieser Richtung wurden denn auch die ersten Schritte getan.

Die Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und konzentrierter Schwefelsäure unter gelindem Erwärmen schien Erfolg zu versprechen. Beim Zersetzen des Reaktionsgemisches mit Wasser wurde ein Körper erhalten, der nach dem Umkristallisieren aus viel Wasser qualitativ und quantitativ den Nachweis von Acetyl gestattete. Aus seiner Lösung in konzentrierter Schwefelsäure ließ sich mit Wasserdampf Essigsäure übertreiben, die in Natronlauge aufgefangen und titriert wurde. Doch gaben die Analysen keine übereinstimmenden Werte. Man erhielt Zahlen, die zwischen denen für ein Diacetylierungsprodukt und ein Monoacetylierungsprodukt lagen (Di- und Mono- bezogen auf ein Molekül Leukopterin). Die Mikrobestimmung von Stickstoff, Kohlenstoff und Wasserstoff stimmte dagegen ganz gut auf ein Produkt, das auf einen Harnsäurerest eine Acetylgruppe enthält. Der erhaltene Körper steht in seinen Reaktionen dem Leukopterin selbst noch sehr nahe. Er hat bis über 300° keinen Schmelzpunkt, gibt Phosphorwolframsäure- und Murexidreaktion, in Soda ist er schwer, in Natronlauge leicht löslich. Organische Lösungsmittel lösen nicht, Wasser in der Siedehitze nur wenig. Alle diese Eigenschaften erschweren die Reinigung des Acetylierungsproduktes und seine Trennung vom Ausgangsmaterial sehr, zumal die nur zur Verfügung stehenden kleinen Mengen die Anwendung von Methoden der fraktionierten Fällung und sehr häufige Umkristallisation fast unmöglich machen. Es wurde daher von einem weiteren Verfolgen dieser Reaktion abgesehen. Erbracht hat sie

den wenigstens qualitativen Beweis des Vorhandenseins einer Atomgruppierung, die leicht acetylierbar ist, leichter als die in der Harnsäure vorliegende.

Harnsäure reagiert nach Biltz[10] mit Essigsäureanhydrid nur bei zwölfstündigem Erhitzen in Pyridinlösung. Es soll sich dabei das 9-Acetyl-2-6-8-trioxy-8-methyl-8-9-Dihydropurin bilden, das bei längerem Kochen Essigsäure abspaltet und in Methylxanthin übergeht.

Will man den gleichen Versuch mit Leukopterin wiederholen, so stört anscheinend seine größere Unlöslichkeit in Pyridin. Es wurde nur Ausgangsmaterial oder ein uneinheitliches Gemisch erhalten.

Auch Versuche, die Wirkung der konzentrierten Schwefelsäure durch Toluolsulfosäure, Zinkchlorid oder wasserfreies Natriumacetat zu ersetzen, schlugen fehl.

Ebenso negativ sind die Ergebnisse bei der Benzoylierung. Sowohl in der Kälte wie in der Wärme in Natronlauge, Soda — oder Pyridinlösung trat mit Benzoylchlorid oder Benzoesäureanhydrid keine Reaktion ein. Niemals ließ sich bei nachfolgendem Behandeln des Reaktionsproduktes mit starkem Alkali Benzoesäure nachweisen. Auch hier scheint die äußerst geringe Löslichkeit des Leukopterins schuld zu sein.

Die Anwesenheit einer Hydroxyl-Gruppe sollte sich ferner durch eine größere Reaktionsfähigkeit des Leukopterins gegenüber anorganischen Säurechloriden ausdrücken. Bekanntlich ist die Harnsäure ziemlich resistent gegen diese Reagentien. Emil Fischer[11] erreicht den Ersatz ihrer Hydroxyl-Gruppen durch Chlor nur durch Erhitzen mit Phosphoroxychlorid im Einschlußrohr. Phosphorpentachlorid gibt Nebenreaktionen und wird daher vermieden. Man erhält dabei gleich das Dichlor-8-Oxy-Purin.

Es scheint, daß auch hier die Versuche der aufgestellten Forderung entsprechen.

Zwar führte die Behandlung mit Thionylchlorid weder am Rückfluß noch im Einschlußrohr zum Ziel. Chlorsulfonsäure wirkte einfach lösend wie konzentrierte Schwefelsäure, Sulfurylchlorid ebenso.

---

[10] Biltz A. 431, 79 (1923).

[11] E. Fischer B. 30, 2208 (1897).

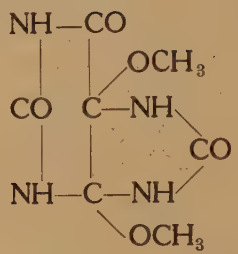
Beim Arbeiten nach Emil Fischers Methode, Erhitzen mit Phosphoroxychlorid im Einschlußrohr und Zersetzen des Reaktionsgemisches mit Wasser, entstand ein gelber Körper im Filtrat, der chlorhaltig war und sich höchstens durch seine größere Löslichkeit in Salzsäure von dem Fischerschen Dichloroxypurin unterschied. Aber einen wichtigen Fortschritt brachte die Einwirkung eines Gemisches von Phosphoroxychlorid und Phosphorpentachlorid bei Wasserbadtemperatur auf Leukopterin. Es tritt alsbald Lösung ein und nach dem Abdampfen des Phosphoroxychlorids und Zersetzen mit Wasser erscheint im Filtrat ein gelber Körper in guter Ausbeute. Er läßt sich über ein Ammoniumsalz reinigen und dann beim Umfällen mit Ammoniak-Essigsäure in zu Rosetten vereinigten Stäbchen erhalten. Die Beilsteinprobe ergibt Chlor, und die Analyse stimmte etwa auf ein Produkt, das zwei Chloratome auf ein Leukopterinmolekül enthält. Etwas zu wenig Chlor wurde gefunden und Kohlenstoff und Wasserstoff entsprechend zu hoch, so daß es scheint, als sei noch etwas Ausgangsmaterial dabei, das sich ja durch die Reinigungsmethode nur schwer entfernen läßt. Man müßte sie schon sehr oft wiederholen, was die geringen Substanzmengen erschweren. Eine andere Art zu reinigen, war nicht zu finden. Mit Natronlauge läßt sich das Chlor entfernen, wobei Leukopterin zurückerhalten wird.

Die geforderte größere Reaktionsfähigkeit des Leukopterins anorganischen Säurechloriden gegenüber ist also in diesem Falle bestätigt. Sollte es sich wirklich um einen Ersatz des am Brückenkohlenstoffatom stehenden Hydroxyl durch Chlor handeln, so wäre vielleicht auf diesem Wege durch Reduktion mit Jodwasserstoffsäure vom Leukopterin zum Xanthopterin zu kommen.

Versuche mit dem Dimethylglykoläther.

Eine Lösung der Frage nach dem Aufbau des Leukopterinmoleküls war bei der geringen Menge Ausgangsmaterial nur von gut kristallisierenden Derivaten aus möglich. Die Ähnlichkeit mit der Harnsäure erlaubte dabei die Übertragung von Reaktionen aus ihrer Chemie.

Der Dimethylglykoläther:



wie er nach Biltz[12] durch Einleiten von Chlor in eine Suspension von Harnsäure in Methylalkohol erhalten werden kann, schien den gestellten Forderungen zu entsprechen. Er wird auf diesem Wege chlorfrei erhalten, läßt sich leicht aus Wasser oder aus Methylalkohol-Äther umkristallisieren und zu weiteren Derivaten abbauen.

Leukopterin gibt unter gleichen Bedingungen ein ähnliches Produkt. Es ging auch beim Chlorieren völlig in Lösung, und beim Eingießen des Reaktionsgemisches in viel Äther schied sich ein amorpher Körper aus, der dem rohen Glykoläther der Harnsäure zu entsprechen schien. Nur seine geringe Kristallisierungstendenz war störend. In den meisten Lösungsmitteln löste er sich zu leicht, so daß er nur durch völliges Einengen wieder zu erhalten war. Aus Methylalkohol-Äther kamen nur Flocken, und mit Wasser erhitzt, zersetzte er sich unter Kohlensäureabspaltung. Erst als man ihn unter Ausschluß jeder Feuchtigkeit herstellte, konnte bei sehr schnellem Arbeiten durch Waschen des ersten amorphen Reaktionsproduktes mit trockenem Aceton ein kristallisierter Körper erhalten werden. Er ließ sich aber im Gegensatz zur Harnsäure nicht vom Chlor befreien. Auch nach mehrfachem Umfällen blieb die Beilsteinprobe positiv, und da sich sogar immer noch mit Silbernitrat in kalt-wässeriger Lösung Chlor nachweisen ließ, war es sicher, daß es sich um ein Chlorhydrat handle. Nach einiger Mühe gelang es auch die freie Base als chlorfreien Körper durch Fällen der methylalkoholischen Lösung mit Pyridin zu erhalten. Sie kommt sofort kristallin und unterscheidet sich durch ihre Schwerlöslichkeit in organischen Lösungsmitteln vom Ausgangsmaterial. Durch methylalkoholische Säure läßt sie sich ins Chlorhydrat zurückverwandeln.

[12] Biltz A. 413, 16 (1917), B. 54, 2477 (1921).

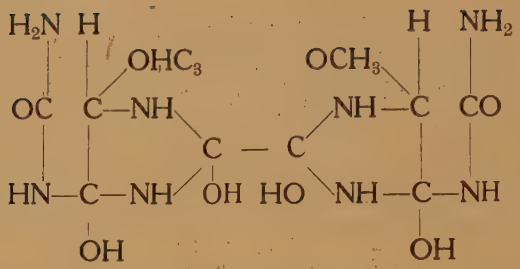
Diese Verhältnisse deuten im Gegensatz zu den bei der Harnsäure vorliegenden auf die Anwesenheit einer freien Aminogruppe hin, wie sie die offene Leukopterinformel fordert. Sie kommt zur Auswirkung hier, wo sie nicht mehr wie beim Leukopterin selbst an einem doppelt gebundenen Kohlenstoff-Atom sich befindet. Quantitativ beweisen ließ sie sich durch eine Van-Slyke-Bestimmung. Harnsäureglykoläther gab dabei keinen Aminostickstoff, Leukopteringlykoläther die der Abspaltung zweier Aminogruppen auf ein Leukopterinmolekül entsprechende Menge.

Die Analysen gaben sonst allerdings wieder kein eindeutiges Bild. Fürs Chlorhydrat stimmen die gefundenen C-H-N-Werte teils für einen Mono- teils für ein Gemisch von einem Mono- und von einem Di-Äther. Für die freie Base wurden Kohlenstoff und Wasserstoff meist zu hoch gefunden. Ein Vergleich mit dem Äther der Harnsäure zeigte aber auch dort die gleiche Unsicherheit. Die C-H-Werte liegen weit höher als die von der Theorie geforderten. Die Reaktion verläuft also entweder nicht eindeutig oder der Glykoläther ist noch instabiler, als man bisher annahm.

Beim Kochen der freien Base mit Wasser wurden auf ein Leukopterinmolekül zwei Moleküle Kohlensäure abgespalten. Es ließ sich aber aus der Lösung nicht Allantoin[13] wie bei der Harnsäure, wohl aber in schönen Kristallen ein Körper erhalten, dessen Zusammensetzung der Analyse nach auf $(C_5H_{11}N_4O_4)_2$ stimmte. Das Vorhandensein der C-C-Brücke noch in diesem Produkt wird wahrscheinlich dadurch, daß sich durch Kochen mit Salzsäure Oxalsäure daraus abspalten läßt. In seinen Löslichkeitsverhältnissen steht es dem Ausgangsmaterial noch sehr nahe. Mit methylalkoholischer Salzsäure und Pyridin läßt es sich umfällen. Die Analyse erwies das Vorhandensein noch einer Methoxyl-Gruppe. Man könnte also versucht sein, in ihm eine Zwischenstufe vom Glykoläther zum Di-Allantoin zu sehen und es gemäß

---

[13] Biltz B. 54, 2465 (1921).



zu formulieren. Die Hydrolyse würde also hier, wenn man den Monoäther als Ausgangsmaterial annimmt, bei der ersten Ringöffnung stehen geblieben sein und darauf das sechste Kohlenstoffatom als Kohlendioxyd abgespalten sein, Vorgänge, die ja auch Biltz[14] für die Spaltung des Harnsäureäthers als primär annimmt, nur daß die Reaktion dort gleich weiter bis zum Allantoin geht.

Verwendet man zur Wasserspaltung von vorn herein das Chlorhydrat der Base, oder spaltet man mit Salzsäure, so tritt sofort Oxalsäure auf. Bei Harnsäure konnte sie nie erhalten werden.

Größere Spaltstücke ließen sich leider sonst nicht fassen. Meist handelte es sich um ein Kristallgemisch, das sich nicht trennen ließ.

Auch hier also wieder bei aller Ähnlichkeit mit Harnsäure deutliche Unterschiede, der vermutete Mehrgehalt an einem Wasserstoffatom gesichert durch die Feststellung einer freien Aminogruppe, und sonst Verhältnisse, die sich recht gut durch die Annahme der Doppelformel erklären lassen.

Oxydationen.

Ein weiterer Gegensatz zwischen Leukopterin und Harnsäure zeigte sich bei ihrem Verhalten bei der Oxydation.

Während Harnsäure bei der Oxydation mit verdünnter oder konzentrierter Salpetersäure in der Wärme oder in der Kälte neben Kohlensäure (1 Molekül CO_2 auf 1 Molekül Harnsäure) in der Hauptsache Alloxan lieferte — bis zu 80% wurden isoliert —, war die Bildung von Alloxan beim Leukopterin so gering, daß es sich durch Reduktion zu Alloxanthin oder durch den Schmelzpunkt nicht nachweisen

[14] Biltz B. 54, 2454 (1921).

ließ. Lediglich die allmähliche Rötung des Reaktionsgemisches und der positive Ausfall der Murexidprobe deutete auf sein Vorhandensein hin. Was für Reaktionsprodukte dafür auftraten ist nicht sicher. Immer ist ein dem Leukopterin anscheinend noch nahestehender Körper zu isolieren infolge seiner Schwerlöslichkeit in säurefreiem Wasser. Er erscheint in gelben Kugeln oder in zu runden Konglomeraten verfilzten Nädelchen, hat keinen Schmelzpunkt, ist löslich in konzentrierter Schwefelsäure und in Alkalien, unterscheidet sich aber vom Leukopterin durch seinen stärker basischen Charakter, läßt sich daher aus Alkali-Säure nicht mehr umfällen und am besten aus verdünnten Säuren umkristallisieren. Die Analyse stimmt am besten auf die Summenformel $C_5H_9N_4O_5$, führt aber nicht zur Aufstellung irgend einer Formel. Die Oxydationsstufe ist dieselbe wie beim Ausgangsmaterial, es sind lediglich zwei Moleküle Wasser pro ein Harnsäurerest addiert. Die Murexidprobe fiel bei diesem Körper negativ aus, auch bei längerem Kochen mit Salpetersäure ließ sich keine Oxalsäure daraus abspalten.

Außer ihm sind nur kleinere Bruchstücke zu fassen, etwa zwei Moleküle Kohlendioxyd, zwei Moleküle Ammoniak pro Leukopterinmolekül und, was im Gegensatz zur Harnsäure bemerkenswert ist, immer Oxalsäure und zwar meist in beträchtlicher Menge, was wieder für die Theorie von der C-C-Brücke zwischen den Harnsäureresten zu sprechen scheint.

Noch weniger übersichtlich ist das Bild, das die Permanganatoxydation liefert. Harnsäure und Leukopterin verbrauchen in alkalischer Lösung etwa die gleiche Menge Permanganat. Kohlensäure läßt sich in beiden Fällen nach dem Ansäuern auch etwa in gleicher Menge auffangen, bei Leukopterin etwas weniger. Während aber bei der Harnsäure der entstandenen Menge Kohlendioxyd eine ebenso große Menge Allantoin entsprach, die sich gut isolieren ließ, ist bei Leukopterin nie gelungen, diese Verbindung zu fassen. Was dafür entstanden ist, ist unklar. In geringen Mengen hat sich wieder der von der Salpetersäureoxydation her bekannte gelbe Körper isolieren lassen, außerdem im Gegensatz zur Harnsäureoxydation Oxalsäure und Ammoniak aber beides nur in Spuren. Der Rest war eine wasserlösliche Schmiere, aus der nichts herauszuholen war.

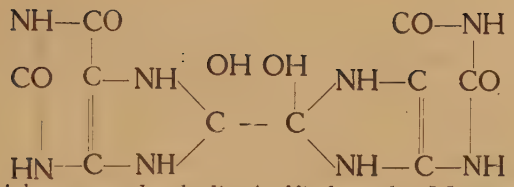
Bei der Oxydation mit Jod in Natronlauge verbrauchen Harnsäure und Leukopterin etwa die gleiche Menge Jod. Da die Aufarbeitung schon für Harnsäure sehr unangenehm ist, wurde von weiterem abgesehen. Die Oxydation mit Chlor in Wasser oder nach Biltz in Eisessig führte zu uneinheitlichen Gemischen und Schmieren.

Nicht besser waren die Ergebnisse mit Wasserstoffperoxyd. Beim Kochen in mineralsaurer und beim Stehenlassen in alkalischer Lösung mit Perhydrol machte die größere Unlöslichkeit des Leukopterins sich geltend. Es blieb immer eine Menge unverändertes Ausgangsmaterial zurück. Da die Verhältnisse auch bei der Harnsäure nicht einfach sind, wurde von weiteren Versuchen abgesehen.

Reduktionsmittel wie Zinkstaub und Jodwasserstoffsäure wirken wie auf Harnsäure auch auf Leukopterin nicht ein. Eine Wasserabspaltung, die man der Formel nach hätte erwarten sollen, trat beim Erhitzen des Natriumsalzes auch auf sehr hohe Temperaturen nicht ein, ebenso nicht bei der eben besprochenen Einwirkung von anorganischen Säurechloriden. Konzentrierte Salzsäure oder sehr starke Natronlauge bewirken keine Hydrolyse. Auch bei stundenlangem Kochen am Rückfluß wurde nur Ausgangsmaterial zurückerhalten. Methylierungsversuche führten nur zu Schmieren in geringer Ausbeute, die zu untersuchen nicht zu lohnen schien.

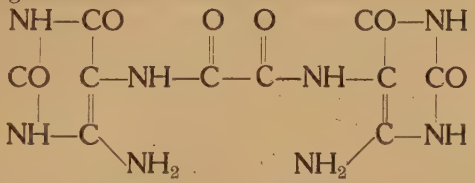
Alles das bestätigte nur von neuem die Ähnlichkeit zwischen Harnsäure und Leukopterin.

Zusammenfassend muß man sagen, die vorliegenden Versuche haben den sicheren Beweis erbracht, daß das Flügelpigment der Pieriden in der Hauptsache wenigstens nicht aus Harnsäure besteht, wie man es bisher annahm. (Ob sie in geringer Menge dabei ist, ließ sich bei der ausgeführten Isolierung und Reinigung nicht sicher entscheiden, gefunden wurde sie nie.) Es ist allerdings ein Körper, der zur Puringruppe gehört und in seinem Verhalten der Harnsäure sehr nahe steht. Im allgemeinen können Reaktionen der Harnsäurechemie direkt übernommen werden. Der positive Ausfall der Murexidreaktion beweist das Vorhandensein des auch in der Harnsäure vorliegenden 6-Ringes. Die Analysen ergaben als einzigen Unterschied den Mehrbesitz eines Wasserstoffatoms. Diesen Tatsachen wird die symmetrische Doppelformel des Leukopterins gerecht:

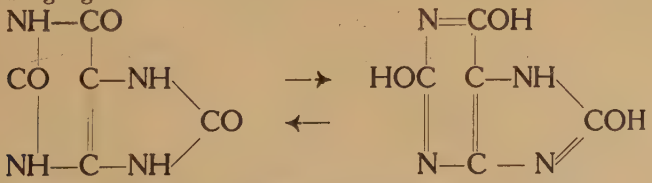


Sie ließ sich stützen durch die Auffindung des Mononatriumsalzes, das pro Leukopterinmolekül nur ein Natriumatom enthält. Das häufige Auftreten der Oxalsäure unter Bedingungen, bei denen sie aus Harnsäure nicht erhalten wurde, scheint für eine C-C-Brücke als Verkettungsstelle zu sprechen. Vielleicht darf man auch in den Spaltungsversuchen des Glykoläthers und in den Oxydationsversuchen einen weiteren Beweis sehen und auf einen größeren Zusammenhalt des Moleküls schließen, indem dem Ausgangsmaterial noch näher stehende Stufen festzuhalten sind.

Neben der geschlossenen steht noch eine offene Formel zur Diskussion:



Die Ergebnisse der Acetylierung und der leichte Ersatz einer Hydroxyl-Gruppe durch Chlor bei der Behandlung mit Phosphoroxychlorid und Phosphorpentachlorid deuten auf das Vorhandensein einer vor den anderen ausgezeichneten Hydroxyl-Gruppe hin. Andrerseits ließ sich beim Glykoläther sogar quantitativ eine freie Amino-Gruppe nachweisen. Beide Ergebnisse sichern noch einmal das Vorhandensein eines überzähligen Wasserstoff-Atoms, lassen sich aber nur dann vereinigen, wenn man zwischen offener und geschlossener Formel eine Art Tautomerie annehmen will, wie sie ja bei der Harnsäure selbst im Sinne des Übergangs



zur Erklärung vieler Reaktionen herangezogen wird. Hier müßte sie allerdings mit einer Ringöffnung verbunden sein.

Bisher wurde das Flügelpigment der Pieriden für Harnsäure und zwar für ein regelmäßiges Endprodukt des Stoffwechsels gehalten. Die Puppe soll ungefähr 2 mg Harnsäure enthalten. Davon soll kurz vor dem Schlüpfen ein Teil in die Flügel gehen und der Rest in den Darm.[15] Nach dem Auskriechen sind die Flügel noch schlaff. Durch lebhafte Pumpbewegungen preßt der Falter von der rotbraunen Flüssigkeit, die den Darm füllt, in die Flügel, wo sie erstarrt. Der überschüssige Saft wird durch den After abgegeben.

Da es nun sicher gestellt ist, daß nicht Harnsäure sondern Leukopterin die weiße Farbe der Pieriden bedingt, erhob sich die Frage, ob Leukopterin auch als regelmäßiges Stoffwechsel-Endprodukt anzusprechen ist, oder ob es speziell zur Ablagerung in den Flügeln gebildet wird. Die Versuche haben für letzteres entschieden.

500 Puppen von Pieris brassicae wurden kurz vor dem Ausschlüpfen in mit Filtrierpapier ausgelegte Kästen gebracht und die Exkremente, die sie im Moment des Auskriechens hinterlassen, untersucht. Es ließ sich in ihnen nicht Leukopterin wohl aber Harnsäure nachweisen. Beim Ausziehen mit Ammoniak und Umfällen mit Natronlauge-Salzsäure wurden Kristalle isoliert, die mit Soda keinen gelben Körper sondern in langen Nadeln das bekannte weiße Natriumsalz der Harnsäure gaben. Auch die Analyse stimmte auf Harnsäure. Die rotbraune Farbe der Exkrementlösung erinnert dabei stark an die braunen Mutterlaugen des Leukopterins. Aus beiden ließen sich purinähnliche Körper nicht weiter isolieren. Auch mit Salzsäure blieb der größte Teil gelöst. Die rotbraune Farbe war durch Reduktionsmittel nicht zum Verschwinden zu bringen. Die Murexidprobe war negativ.

Die Fällbarkeit durch Schwermetallsalze und Ammonsulfat und eine allerdings mehr orientierende Stickstoffbestimmung, die 11,8% ergab, legen die Vermutung nahe, daß es sich um einen eiweißähnlichen Körper handele, der eine Farbstoffkomponente enthält, und die rotbraune Färbung der im Darm kurz vor dem Schlüpfen enthaltenen Flüssigkeit ausmacht, von wo er dann teils in die Flügel gepumpt wird, teils durch den After abgegeben.

Die Farbe der Flügel dagegen bedingen nicht regelmäßig im Stoffwechsel auftretende Produkte sondern eigens dafür aufgebaute Stoffe, die Dipurine.

[15] Wigglesworth, Proc. Royal Soc. London Serie B. 97, 149 (1924), C. 1925, I 243.

Experimenteller Teil.

I. Isolierung.

Die Isolierung des Flügelpigments wurde bei Faltern der Gattung Pieris napi, Pieris rapae, Pieris brassicae getrennt unternommen. Die erhaltenen Farbstoffe erwiesen sich aber als identisch.

150 g Schmetterlingsflügel (entsprechend etwa 27—28000 Faltern) wurden im Extraktionsapparat erschöpfend mit Äther extrahiert. Dabei lösen sich etwa 15 g Fette und Wachse, die gelb gefärbt sind.

Die Flügel werden dann zuerst ein paar Mal mit Wasser durchgeknetet, bis das Filtrat nicht mehr deutlich grün gefärbt ist, darauf etwa sechs- bis siebenmal mit je 4 l etwa halbnormalem Ammoniak einige Stunden in der Kälte unter häufigem Umschütteln extrahiert. — Natronlauge ist nicht so empfehlenswert, da sie noch alle möglichen anderen Stoffe löst, die sich nur schwer vom Leukopterin trennen lassen. — Beim Behandeln mit Ammoniak bleiben die Flügel durchsichtig und farblos, aber in ihrem Chitingefüge noch vollständig erhalten zurück.

Die durch Absaugen gewonnenen Lösungen sind hellbräunlich. Man arbeitet die erste noch dunkler gefärbte für sich und die anderen gemeinsam auf. Ein getrenntes Behandeln auch der zweiten und folgenden Extraktionen ist nicht nötig, da sich ein Unterschied in Kristallform, Analyse und Reaktionen zwischen den aus ihnen gewonnenen Produkten nicht nachweisen ließ. Die Lösungen werden auf dem Wasserbad zur Trockne eingedampft. Einengen im Vakuum, wie es am Anfang ausgeübt wurde, bietet keine Vorteile, vielmehr ist das starke Schäumen der Extrakte sehr hinderlich.

Das sich ausscheidende gelblichbraune Ammonsalz wird, in etwa 10%igem Ammoniak suspendiert, zentrifugiert und mit gleich starkem Ammoniak so lange gewaschen, bis die abzentrifugierte Lösung hell aussieht. Wäscht man mit Wasser oder stark verdünntem Ammoniak, so löst sich ein großer Teil des Salzes kolloidal. Durch Eindampfen

der Waschwässer ist er nur schwer wiederzugewinnen. Aus der zentrifugierten Lösung erhält man beim völligen Eindunsten im Vakuumexsikkator eine beträchtliche Menge eines amorphen dunkelbraunen Rückstandes, der in seinem Verhalten der in analoger Weise aus dem Zitronenfalter gewonnenen dunkelgrünen Substanz sehr ähnlich ist. Um einen purinähnlichen Körper scheint es sich nicht zu handeln. Mit Salzsäure läßt sich nur ein kleiner Teil fraktioniert fällen, die Farbe durch Reduktion mit Zinkstaub nicht entfernen, die Murexidprobe ist negativ, Schwermetallsalzlösungen fällen, ebenso Phosphorwolframsäurelösung und Ammonsulfat. Die Biuretreaktion ließ sich nicht ausführen, da die starke Eigenfärbung der Lösung hinderte. Zur Analyse wurde der mit Salzsäure gefällte Teil bei 150° im Vakuum getrocknet.

4,329 mg Sbst. 0,463 ccm N (20° 728 mm)

11,8 % N

Zur Darstellung des freien Leukopterins wird das erhaltene Ammoniumsalz in 2 — n Natronlauge gelöst, mit überschüssiger verdünnter Salzsäure gefällt und kurz aufgekocht, wobei sich die zuerst flockig erscheinende freie Säure zusammenballt und zu Boden setzt. Am nächsten Tag wird sie abzentrifugiert, erst mit verdünnter Salzsäure, dann mit Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die Ausbeute beträgt 11,1 g, ein Falter enthält also etwa 0,4 mg Leukopterin.

Die so erhaltenen Rohprodukte sind schon verhältnismäßig rein. Das aus dem ersten Extrakt stammende sieht noch rötlichbraun, die übrigen aber nur schwach gelblich aus. Kristallisiert sind sie nicht, lassen sich aber ohne weitere Behandlung für die meisten folgenden Versuche verwenden.

Zur Reindarstellung werden je 0,1 g Leukopterin in 100 ccm 1—n Soda gelöst, mit 0,15 g Tierkohle (Kahlbaum) kurze Zeit gekocht und die nur noch schwach gelbliche Lösung heiß in 100 ccm siedende 2—n Salzsäure getropft. Dabei scheidet sich die Substanz langsam in einer Ausbeute von 50—60 % in schönen, fast farblosen Kristallen ab, die meist Sechseckform zeigen, wobei die Ecken ganz abgerundet oder unter Einbuchtung der Seiten ausgezogen sein können. Nochmaliges Umfällen bedingt keine nachweisbare weitere Reinigung.

Zur Analyse wurde bei 150° im Vakuum der Wasserstrahlpumpe getrocknet.

Leukopterin aus Pieris napi:

4,089 mg Sbst. (keine Abnahme beim Trocknen): 5,33 mg CO_2 1,18 mg H_2O
3,949 mg Sbst.: 5,16 mg CO_2 1,14 mg H_2O
2,797 mg Sbst.: 0,853 ccm N (21° 718 mm)
3,714 mg Sbst. (Abnahme beim Trocknen 0,8%): 4,94 mg CO_2 1,04 mg H_2O
2,103 mg Sbst.: 0,647 ccm N (22° 717 mm)

Leukopterin aus Pieris brassicae:

2,808 mg Sbst.: 3,677 mg CO_2 0,798 mg H_2O
2,809 mg Sbst.: 3,698 mg CO_2 0,846 mg H_2O
2,414 mg Sbst.: 0,723 ccm N (17° 708 mm)
3,742 mg Sbst.: 4,97 mg CO_2 1,05 mg H_2O
3,700 mg Sbst.: 4,94 mg CO_2 1,06 mg H_2O
2,511 mg Sbst.: 0,743 ccm N (16° 715 mm)

Harnsäure: $C_5H_4O_3N_4$ (168,0)	Ber.	35,76 C	2,40 H	33,35 N
Leukopterin: $C_5H_5O_3N_4$ (169,0)	„	35,49	2,98	33,16
Pieris napi	Gef.	35,55	3,23	33,45
		35,64	3,23	33,58
		36,28	3,13	
Pieris brassicae		35,73	3,18	32,84
		35,92	3,37	32,88
		36,22	3,14	
		36,41	3,21	

Ein gleichzeitig analysiertes Harnsäurepräparat ergab:
35,71 C 2,30 H

Die von Hopkins veröffentlichten Analysen stimmen mit den oben angegebenen überein.

II. Salze.

Leukopterin löst sich in der Hitze in 1—n Sodalösung recht gut. Beim Abkühlen erscheint ein hellzitronengelbes Natriumsalz in kuge-

ligen Aggregaten. Es wird abgesaugt, mit wenig Wasser gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Der Analyse nach besitzt es die Zusammensetzung $C_{10}H_9O_6N_8Na + 2\,H_2O$.

9,117 mg Sbst. verloren beim Trocknen im Vakuum der Wasserstrahlpumpe bei 150° 0,900 mg H_2O; 7,182 mg Sbst. verloren 0,704 mg H_2O.

$C_{10}H_9O_6N_8Na + 2\,H_2O$ (396,0) Ber. H_2O 9,09 Gef. 9,88
9,80

8,211 mg getrocknetes Na-Salz: 1,564 mg Na_2SO_4
6,482 mg getrocknetes Na-Salz: 1,231 mg Na_2SO_4
$C_{10}H_9O_6N_8Na$ (360,0) Ber. Na 6,39 Gef. 6,17
6,15

Das getrocknete Natriumsalz ist äußerst hygroskopisch. Harnsäure gibt unter den gleichen Bedingungen das farblose Mono-Natriumsalz der Zusammensetzung $C_5H_3O_3N_4Na + {}^1/_2H_2O$.

Das Kaliumsalz ist schwer rein darzustellen. Aus 1—n Pottaschelösung kristallisiert immer ein Gemisch von Mono- und Di-Kaliumsalz des Leukopterins, das der Analyse nach aus 30% Mono- und 70% Di-Kaliumsalz besteht. Unter dem Mikroskop sieht man neben ziemlich langen farblosen Nadeln dichte Aggregate sehr kurzer Nädelchen, die gelblich gefärbt sind.

Das Silbersalz erhält man nur als gelbe, gallertige Fällung mit Silbernitrat aus einer Lösung von Leukopterin in etwa 0,2-normalem Ammoniak. Es zersetzt sich beim Trocknen.

Das Bariumsalz wird aus der ammoniakalischen Leukopterinlösung mit Barytwasser als amorpher, gelblicher sehr schwer löslicher Niederschlag gefällt.

III. Titration.

0,0102 g Leukopterin in 10,0 ccm 0,1—n NaOH gelöst, verbrauchen bis zum Umschlagspunkt von Phenolphthalein 9,4 ccm 0,1—n HCl; 0,0109 g in 10,0 ccm 0,1—n NaOH gelöst, verbrauchen analog 9,4 ccm 0,1—n HCl.

Ber. für die Bildung des Salzes $(C_5H_4O_3N_4Na)_2$ ein Äquivalent von 168 Gef. 170, 181.

Harnsäure titriert sich unter denselben Bedingungen ebenfalls als einbasische Säure.

IV. Phosphorwolframsäurereaktion.

Je 2,0 mg Leukopterin werden in 2 ccm 4—n Sodalösung mit 1 ccm Phosphorwolframsäurelösung versetzt, und die auftretende Blaufärbung mit der einer analog aus 2,0 mg Harnsäure bereiteten Lösung im Colorimeter verglichen. Die hellgelben Rohpräparate zeigen dabei eine Farbintensität, die nur etwa 20% der einer gleich konzentrierten Harnsäurelösung entspricht. Die Sodalösung des Erstproduktes ist dagegen so dunkel, daß ein Vergleich mit Harnsäure nicht möglich ist. Umkristallisierte Präparate geben die Reaktion in gleicher Stärke. Sie ist auch sonst nicht völlig zum Verschwinden zu bringen. Weder Auskochen mit Natriumnitrit-Lösung oder wässrigem Pyridin, noch Kochen mit Zinkstaub in alkalischer Lösung, noch fraktionierte Fällung ändert etwas an ihrer Intensität. Auch wenn man in alkalischer Lösung den größten Teil des Leukopterins durch Wasserstoffperoxyd oder Kaliumpermanganat zerstört, zeigt der mit Säure gefällte unangegriffene Rest die gleiche Blaufärbung wie die ursprüngliche Substanz.

V. Acetylierungsversuche:

1. mit Essigsäureanhydrid und Schwefelsäure.

0,1 g Leukopterin wird mit 0,3 ccm konzentrierter Schwefelsäure und mit 6 ccm Essigsäureanhydrid eine halbe Stunde lang auf dem siedenden Wasserbad am Rückfluß erwärmt. Es tritt dabei keine völlige Lösung ein, das Gemisch färbt sich dunkelbraun. Nach dem Erkalten wird der Rückstand abfiltriert. Im Filtrat zeigen sich beim Zersetzen mit Wasser wenig braune Flocken. Beim Eindunsten im Vakuum hinterbleibt eine braune Schmiere, die man auch ohne Leukopterin beim Erwärmen von Schwefelsäure und Essigsäureanhydrid allein unter den gleichen Bedingungen erhält. Sie wird daher bei der weiteren Aufarbeitung vernachlässigt. Der Rückstand wird mit Wasser gewaschen, bis das Filtrat nur noch hellgelblich ist. Nach dem Trocknen sind es etwa 0,1 g.

Er sieht dunkelbraun aus, hat bis 340° keinen Schmelzpunkt, färbt sich nur allmählich dunkel beim Erhitzen. Er ist in Soda und Natron-

lauge löslich, unlöslich in organischen Lösungsmitteln. Das Umkristallisieren gelingt am besten aus heißem Wasser. Doch scheint bei längerem Kochen eine Trübung aufzutreten. Man erhitzt infolgedessen am besten das Wasser (100 ccm) zum Sieden, gibt die mit etwas kaltem Wasser angeriebene Substanz (0,1 g) dazu und filtriert schnell. Schon bald erscheinen im Filtrat Kristalle, die die Form langgezogener Rhomboeder haben.

In konzentrierter Salzsäure lösen sie sich kalt. Beim Erhitzen im geschlossenen Rohr erscheint aber bald ein kristallisierter Niederschlag, wohl infolge einer Verseifung.

Beim Kochen mit Natronlauge und darauffolgendem Ansäuern läßt sich mit Wasserdampf Essigsäure übertreiben.

Acetylbestimmung:

Zur Acetylbestimmung werden etwa 20 mg der aus Wasser umkristallisierten Substanz konstant bei 140° im Vakuum getrocknet, kalt in 1 ccm konzentrierter Schwefelsäure gelöst, mit 2—3 ccm Wasser versetzt, zum Sieden erhitzt und die so gebildete Essigsäure mit Wasserdampf abdestilliert, so lange bis das Destillat gegen Lakmus nicht mehr sauer reagiert. Die übergegangene Flüssigkeit wird mit $^1/_{20}$—n Natronlauge titriert.

0,0086 mg Sbst. : 0,65 ccm NaOH
0,0226 mg Sbst. : 1,86 ccm NaOH
0,0315 mg Sbst. : 2,56 ccm NaOH

Diacetylprodukt $(C_7H_7O_4N_4)_2$	Ber. 20,38 %	Acetyl
Monoacetylprodukt $(C_{12}H_{12}O_7N_8)$	„ 11,32 %	„
	Gef. 16,25 %	„
	„ 17,70 %	„
	„ 17,48 %	„

Bei einem Versuch mit Leukopterin selbst unter gleichen Bedingungen wurde keine wasserdampfflüchtige Säure gefunden.

Analysen:

Zur Analyse wurde ebenfalls aus Wasser umkristallisiert und bei 140° im Vakuum der Wasserstrahlpumpe getrocknet.

5,400 mg Sbst.:	8,02 mg CO_2	1,48 mg H_2O
2,738 mg Sbst.:	0,677 ccm N	(23° 725 mm)

Diacetylprodukt $(C_7H_7O_4N_4)_2$	Ber. 39,81 C	3,32 H	26,54 N
Monoacetylprodukt $(C_{12}H_{12}O_7N_8)$	„ 37,89	3,16	29,5
	Gef. 40,51	3,07	27,2

2. Acetylierung mit Essigsäureanhydrid und Pyridin.

0,1 g Leukopterin werden mit 3 ccm Essigsäureanhydrid und sieben Tropfen Pyridin (beides frisch destillisiert) 47 Stunden am Rückfluß gekocht. Es tritt keine Lösung ein. Am Rande des Reaktionskölbchens setzt sich eine graubraune Kruste ab. Das Reaktionsgemisch wird filtriert und mit Wasser gewaschen. Der Rückstand — etwa 0,1 g — läßt sich aus Wasser wie der mit Schwefelsäure erhaltene umkristallisieren, kommt aber deutlich uneinheitlich heraus. Auch wenn man das Filtrat schnell in Eis kühlt, wird keine fraktionierte Fällung erreicht.

Erhitzt man 10 mg Leukopterin mit $1^1/_2$ ccm Pyridin und 1 ccm Essigsäureanhydrid im Einschlußrohr auf 140^0—160^0 im Schüttelofen, so scheint sich der größte Teil zu lösen. Beim Öffnen ist kaum Druck in der Röhre. Der Inhalt wird mit Wasser verdünnt und filtriert. 2 mg Rückstand bleiben auf dem Filter, die sich wie Leukopterin verhalten. Das Filtrat gibt beim Eindampfen nur eine braune Schmiere, die in Wasser spielend löslich ist, mit Natronlauge Flocken gibt und sich in Salzsäure löst. Es ist also weitgehende Zersetzung eingetreten.

Beim Erwärmen von Leukopterin mit Essigsäureanhydrid und Chlorzink tritt dieselbe Dunkelfärbung ein wie mit Schwefelsäure.

Erhitzt man es mit Essigsäureanhydrid und entwässertem Natriumacetat im Einschlußrohr drei Stunden, so erhält man beim Zersetzen des Reaktionsgemisches mit Wasser einen Körper, der sich in Reaktionen und Kristallform nicht vom Ausgangsmaterial unterscheidet.

VI. Benzoylierungsversuche:

1. mit Benzoylchlorid.

Eine Lösung von 0,1 g Leukopterin in Soda wird unter Eiskühlung tropfenweise mit Benzoylchlorid versetzt und jedesmal geschüttelt, bis dessen durchdringender Geruch verschwunden ist. Es fällt bald ein gelblicher Körper aus, der wie das Mono-Natriumsalz des Leukopterins aussieht. Die Lösung ist noch gegen Lakmus alkalisch. Bei Zusatz eines Tropfens verdünnter Natronlauge verschwindet er, um mit

weiterem Benzoylchlorid wiederzukommen. Nachdem etwa im ganzen 1 ccm Benzoylchlorid zugegeben ist, wird das Reaktionsgemisch angesäuert und ausgeäthert. Der hierbei ausfallende Niederschlag und die ausgeätherte wässrige Schicht werden längere Zeit mit starker Natronlauge gekocht. Nach dem Ansäuern läßt sich Benzoesäure nicht nachweisen. Der zum Ausschütteln verwandte Äther hinterläßt beim Abdampfen keinen Rückstand. Das eingesetzte Leukopterin ist unverändert zurückzuerhalten.

Löst man Leukopterin heiß in Soda und gibt bei Wasserbadtemperatur tropfenweise Benzoylchlorid dazu, so zeigt sich genau dasselbe Bild. Wieder fällt der gelbliche Körper aus, der sich in einem Tropfen Natronlauge spielend löst. Bei gleicher Aufarbeitung ist wieder keine aus einem Benzoylprodukt stammende Benzoesäure nachzuweisen, sondern nur unverändertes Ausgangsmaterial.

0,1 g Leukopterin wird mit etwa 3 ccm Pyridin im Wasserbad erwärmt und zur Suspension tropfenweise Benzoylchlorid gegeben, das Reaktionsgemisch dann mit Äther gewaschen, getrocknet und durch Wasser vom Pyridinchlorhydrat befreit. Kocht man nun den Rückstand etwa eine Stunde mit 4,5—n Natronlauge, säuert an und äthert aus, so läßt der Äther sich wieder ohne Rückstand verdampfen und das Ausgangsmaterial unverändert zurückgewinnen. Benzoylierung scheint nicht eingetreten zu sein.

2. mit Benzoesäureanhydrid.

Wird 1 g Benzoesäureanhydrid mit 50 mg Leukopterin und fünf Tropfen konzentrierter Schwefelsäure drei Stunden im Wasserbad erhitzt, so färbt sich das Gemisch dunkelbraun, Leukopterin geht nicht in Lösung. Mit Äther wird das überschüssige Benzoesäureanhydrid entfernt und der Rückstand durch Kochen mit Natronlauge verseift. Bei gleicher Aufarbeitung wie oben ist Benzoesäure nicht zu erhalten, wohl aber unverändertes Leukopterin.

Verwendet man so viel Schwefelsäure, daß das Leukopterin sich darin löst, so sind die Verhältnisse die gleichen.

VII. Einwirkung von anorganischen Säurechloriden:

1. Thionylchlorid,

30 mg Leukopterin werden vier Stunden mit 4 ccm Thionylchlorid am Rückfluß auf dem Wasserbad gekocht. Das Thionylchlorid wird dann verjagt. Der Rückstand gibt alle Reaktionen des unveränderten Ausgangsmaterials.

2. Chlorsulfonsäure.

Leukopterin löst sich sofort in Chlorsulfonsäure auf. Zersetzt man die Lösung mit Wasser, ganz gleich, ob sofort, nach längerem Stehenlassen, oder nach einstündigem Erwärmen auf 100°, so erscheinen die gleichen Knöpfchen, wie sie beim Umkristallisieren von Leukopterin aus konzentrierter Schwefelsäure erhalten werden. Sie geben die Reaktionen des Ausgangsmaterials.

3. Sulfurylchlorid.

Läßt man eine Mischung von 20 mg Leukopterin und 1 ccm Sulfurylchlorid einen Tag lang stehen, so verschmiert sie. Ein braunes Öl schwimmt auf der Flüssigkeit. Das Sulfurylchlorid läßt sich abgießen und gibt beim Abdampfen keinen Rückstand. Aus dem Öl erhält man nach dem Waschen mit Äther und Zersetzen mit Wasser ein dunkles amorphes Pulver, das alle Reaktionen des Ausgangsmaterials gibt.

4. Phosphoroxychlorid.[1]

0,1 g Leukopterin-Kalium (hergestellt nach den Angaben von Biltz[2] für das harnsaure Kalium, durch Ausfällen aus einer Lösung von Leukopterin in Kalilauge mit Alkohol und Trocknen im Vakuum) werden mit 0,12 g Phosphoroxychlorid im Einschlußrohr sechs Stunden lang auf 160° erhitzt. Die gelblich-grün gefärbte Masse wird mit Wasser zersetzt und filtriert. Aus dem Filtrat scheidet sich bei längerem Stehen ein gelber Körper aus. Der Rückstand gibt mit 18%iger Salzsäure ausgekocht, dasselbe Produkt, wenn man vorsichtig arbeitet, deutlich kristallisiert. Die Ausbeute ist aber im ganzen sehr schlecht.

---

[1] E. Fischer B. 30, 2208 (1897).

[2] Biltz A. 423, 259 (1921).

Der Körper hat keinen Schmelzpunkt, er gibt die Murexidreaktion, mit Soda-Salzsäure läßt er sich umfällen. Nach Beilstein ist Halogen nachzuweisen.

Erwärmt man statt im Einschlußrohr direkt am Rückfluß, so ist das Ergebnis das gleiche. Die Ausbeute ist nicht besser. Die erhaltenen Produkte verschmieren sehr leicht beim Trocknen.

5. Phosphoroxychlorid und Phosphorpentachlorid.

0,2 g Leukopterin geht mit der fünffachen Menge Phosphorpentachlorid und mit 10 ccm Phosphoroxychlorid eine $^3/_4$ Stunde am Rückfluß auf dem Wasserbad gekocht, fast völlig in Lösung. Das Phosphoroxychlorid wird im Paraffinbad verdampft, der übrig bleibende feste Rückstand mit Wasser unter Kühlung zersetzt. Es entsteht eine gelbe Lösung, die sofort filtriert wird. Der Rückstand besteht aus wenig Schmieren. Nach eintägigem Stehen hat sich aus dem Filtrat ein gelbes Pulver ausgeschieden, das in Knöpfchen kristallisiert und einheitlich aussieht. Die Mutterlauge gibt nach dem Eindampfen im Exsikkator und Zersetzen mit Wasser eine weitere Menge. Ausbeute etwa 60%.

Der Körper hat keinen Schmelzpunkt, sondern färbt sich beim Erhitzen nur allmählich dunkel. Laugen lösen ihn leicht, Salzsäure schwer, organische Lösungsmittel nicht. Mit verdünnter Salpetersäure eingedampft, gibt er Murexid. Die Beilsteinprobe auf Halogen ist deutlich positiv. Mit Silbernitrat entsteht keine Fällung.

Die Reinigung geschieht über das Ammoniumsalz.[3] 60 mg Rohprodukt werden heiß in 25 ccm 0,4prozentigem Ammoniak gelöst, die Lösung filtriert und abkühlen gelassen. Geschieht das langsam genug, so kann das Ammonsalz in Kristallen erhalten werden. Meist kommt es aber amorph. Es wird abzentrifugiert, mit kaltem Wasser gewaschen und die Reinigung noch einmal wiederholt. Dann löst man es wieder in Ammoniak und läßt die Lösung in 50 ccm verdünnte Essigsäure in der Hitze tropfen. Der Niederschlag darf nicht sofort auftreten. Kann er sich langsam bilden, so scheiden sich Kristalle ab, Stäbchen, die zu Rosetten vereinigt sind.

---

[3] E. Fischer B. 30, 2236 (1897).

Zur Analyse wurde das gereinigte Produkt bei 120° im Vakuum der Wasserstrahlpumpe konstant getrocknet, zum Vergleich auch eine Bestimmung des Rohproduktes gemacht. Sie ergaben:

Rohprodukt: 3,782 mg Sbst. (Abnahme beim Trocknen 0,9%)
4,67 mg CO_2 0,75 mg H_2O

Gereinigtes: 7,063 mg Sbst. (keine Abnahme beim Trocknen)
4,51 mg AgCl 0,012 mg Rückst.
4,203 mg Sbst. 2,75 mg AgCl 0,01 mg „
2,674 mg Sbst. 0,735 ccm N (22° 723 mm)
4,206 mg Sbst. 5,06 mg CO_2 0,98 mg H_2O

Dichlorleukopterin ($C_5H_4O_2N_4Cl$) (187,5)

	C	H	N	Cl
Ber.	32,0	2,13	29,87	18,93
Rohprodukt: Gef.	33,68	2,22		
Gereinigtes: „	32,81	2,61	30,24	15,83
				16,20

Berechnet für
80% Dichlorleukopterin und 20% Leukopterin:
C 32,70 H 2,30 N 30,53 Cl 15,14

Verseifung:

20 mg Dichlorleukopterin werden vier Stunden lang möglichst unter Rückfluß im Silbertiegel mit halogenfreier 6—n-Natronlauge erhitzt. Ab und zu muß das verdunstete Wasser ersetzt werden. Die gelbliche Lösung wird dann heiß in verdünnte Essigsäure getropft. Es scheiden sich langsam Kristalle ab, die Lanzettenform haben. Das Filtrat gibt deutlich Halogenreaktion. Nach dem Umkristallisieren aus Natronlauge-Essigsäure sind die Kristalle halogenfrei. Sie geben Murexid und haben keinen Schmelzpunkt. Auch die Analysenwerte stimmen auf Leukopterin. Es wurde bei 120° im Vakuum der Wasserstrahlpumpe getrocknet.

3,632 mg Sbst. (keine Abnahme beim Trocknen)
4,69 mg CO_2 0,94 mg H_2O 0,09 mg Rückst.
(grau, unverbrennlich)

Leuk. $C_5H_5O_3N_4$ (169): Ber. C 35,49 H 2,98
Gef. 36,11 2,97

VIII. Anlagerung von Methoxyl an die Doppelbindung.

1. Darstellung von Glykoldimethyläther-chlorhydrat.

0,15 g Leukopterin, fein zerrieben, werden in 2 ccm wasserfreiem (über Calciumoxyd und Natrium destilliertem) Methylalkohol suspendiert und unter Schütteln und Kühlen mit Eiswasser in sehr schnellem Chlorstrom chloriert. Es tritt dabei Erwärmung auf, die so lebhaft werden kann, daß sich das Gemisch entzündet. In kurzer Zeit ist alles gelöst und hat dabei eine gelbe Farbe angenommen. Es wird sofort in etwa 100 ccm absoluten Äther gegossen, der amorphe Niederschlag gleich filtriert — meist läßt sich der Äther direkt von der am Boden sitzenden klebrigen Masse abgießen — und schnell ein paar Mal mit Äther gewaschen. In 100 ccm trocknem Aceton löst sich das meiste und kommt sehr bald deutlich kristallisiert wieder. Ausbeute: 0,12 g = 50%. Absolut trockne Reagenzien und sehr schnelles Arbeiten sind erforderlich. (Ein Versuch in feuchtem Methylalkohol [90%ig] zu chlorieren, schlug fehl.) Achtet man darauf nicht, so fällt beim Eingießen des Reaktionsgemisches in Äther zwar die gleiche amorphe Substanz aus, sie geht aber nicht in Aceton und kann nur durch mehrfaches Anreiben mit Äther pulvrig erhalten werden. Umkristallisieren läßt sie sich nicht. In Methylalkohol oder Wasser ist sie zu leicht, in Aceton und Äther nicht löslich. Aus einem Gemisch von beiden wurden nur Flocken erhalten.

Die gleichen Eigenschaften zeigen die aus Aceton erhaltenen Kristalle. Auch sie lassen sich nur schwer umkristallisieren, für Aceton sind sie unlöslich geworden. Einen Schmelzpunkt besitzen sie nicht. Beim Erhitzen färben sie sich von 120° an gelblich und sind bei 240° dunkelbraun. Sie geben deutlich Halogenreaktion nach Beilstein. Mit Silbernitrat läßt sich aus der kalt wässrigen Lösung ein erheblicher Silberchloridniederschlag fällen.

Analysen:

Kristalle aus Aceton (es wurde in nicht wasserfreiem Methylalkohol chloriert).

3,982 mg Sbst. (Abnahme beim Trocknen bei 60° im Vakuum etwa 1%)
4,17 mg CO_2 1,26 mg H_2O 0,096 mg Rückst.

3,115 mg Sbst. (mit CuO verbrannt)
3,59 mg Sbst. (mit CuO verbrannt)
3,25 mg CO_2 1,09 mg H_2O
3,76 mg CO_2 1,23 mg H_2O
3,543 mg Sbst. 0,7 ccm N (20° 715 mm)
4,696 mg Sbst. (Abnahme beim Trocknen 3,95%)
3,43 mg AgJ
3,949 mg Sbst. 2,63 mg AgJ
5,130 mg Sbst. 3,94 mg AgJ

Kristalle aus Aceton (es wurde in absolut trocknen Lösungsmitteln gearbeitet).

4,294 mg Sbst. (Abnahme beim Trocknen zirka 2%)
4,68 mg CO_2 1,66 mg H_2O
3,201 mg Sbst. 3,49 mg CO_2 1,16 mg H_2O 0,037 mg Rückst.

Dimethylglykoläther-chlorhydrat: $C_7H_{12}O_5N_4Cl$ (267,5)
Ber. C 31,4 H 4,49 N 20,93 OCH_3 23,18

Monomethylglykol-halbäther-chlorhydrat: $C_6H_{10}O_5N_4Cl$ (253,5)
Ber. C 28,4 H 3,95 N 22,09 OCH_3 12,23
Gef. 28,56 3,53 21,66 9,65
aus nicht wasserfreiem CH_3OH
28,45 3,92 8,8
28,56 3,83 10,15
aus wasserfreiem CH_3OH
29,73 4,32
29,74 4,06

2. Darstellung der freien Base.

Die freie Base erhält man aus der methylalkoholischen Lösung des Chlorhydrats mit Pyridin. Gibt man etwas mehr als die berechnete Menge hinzu, so trübt sich die Lösung schon nach kurzer Zeit und bald erscheint ein erheblicher Niederschlag von schönen stäbchenförmigen Kristallen. Ausbeute 70%. Statt Pyridin läßt sich auch Trimethylamin verwenden.

Die so erhaltene Substanz ist halogenfrei. Sie hat keinen Schmelzpunkt, sondern färbt sich nur beim Erhitzen von 160° an allmählich dunkel. Sie ist unlöslich in Methylalkohol und in organischen Lösungs-

mitteln. Aus siedendem Wasser läßt sie sich umkristallisieren, doch zersetzt sie sich bei längerem Kochen unter CO_2-Entwicklung. Auf Zusatz eines Tropfens Säure bildet sich das Chlorhydrat zurück.

Analysen:

Rohprodukt aus nicht kristallisiertem Chlorhydrat:

4,354 mg Sbst. (bei 80° im Vakuum getrocknet)
6,01 mg CO_2 1,85 mg H_2O

2,959 mg Sbst. 0,618 ccm N (23° 729 mm)

8,201 mg Sbst. 10,27 mg AgJ

Rohprodukt aus kristallisiertem Chlorhydrat:

3,694 mg Sbst. (Abnahme 1,8% beim Trocknen bei 100°)
4,66 mg CO_2 1,41 mg H_2O 0,012 mg Rückst.

Sbst. zweimal aus Wasser umkristall., Chlorhydrat nicht krist.:

3,43 mg Sbst. 4,43 mg CO_2 1,38 mg H_2O

3,971 mg Sbst. 0,947 ccm N (21° 721 mm)

Sbst. zweimal aus Methylalkohol-Pyridin umgefällt, Chlorhydrat nicht kristallisiert:

3,559 mg Sbst. 5,07 mg CO_2 1,51 mg H_2O 0,018 mg Rückst.

4,158 mg Sbst. 0,981 ccm N (21° 708 mm)

4,957 mg Sbst. 8,60 mg AgJ

Harnsäuredimethylglykoläther, hergestellt nach Biltz[4] einmal aus Wasser umkristallisiert:

3,411 mg Sbst. 4,76 mg CO_2 1,32 mg H_2O

4,630 mg Sbst. 0,9983 ccm N (21° 713 mm)

8,029 mg Sbst. 16,10 mg AgJ

Zweimal aus Wasser umkristallisiert:

3,825 mg Sbst. 5,26 mg CO_2 1,38 mg H_2O

Einmal aus Methylalkohol-Äther umgefällt:

0,1506 g Sbst. (bei 80° im Vakuum getrocknet)
0,2116 g CO_2 0,0629 g H_2O

0,1454 g Sbst. 31 ccm N (14° 716,5 mm)

Zweimal aus Methylalkohol-Äther umgefällt:

0,0994 g Sbst. (bei 100° im Vakuum Abnahme 4,4%)

[4] A. 413, 16 (1917) und B. 54, 2477 (1921).

0,1382 g CO_2 0,043 g H_2O

0,1274 g Sbst. (Abnahme 4,7%)

0,1742 g CO_2 0,0524 g H_2O

Dimethylglykoläther des Leuk. (freie Base) $C_7H_{11}O_5N_4$ (231)

Ber. C 36,36 H 4,76 N 24,24 OCH_3 26,84

Monomethylglykolhalbäther (freie Base) $C_6H_9O_5N_4$ (217)

Ber. C 33,18 H 4,15 N 25,81 OCH_3 14,29

Rohprodukt:

Gef.	37,65	4,76	23,1	16,54
	34,52	4,28		

Zweimal aus Wasser:

35,22	4,50	26,26	

Zweimal aus Methylalkohol-Pyridin:

39,05	4,77	25,53	22,92

Harnsäuredimethylglykoläther: ($C_7H_{10}O_5N_4$ (230)

Ber.	C 36,52	H 4,35	N 24,35	OCH_3 26,96
Gef.	38,06	4,33	23,50	26,5
	37,50	4,04		
	38,32	4,67	23,75	
	37,92	4,84		
	38,10	4,70		

3. Bestimmung des Aminostickstoffs nach Van Slyke.

Salpetrige Säure wirkt unter Stickstoffentwicklung auf die freie Base des Leukopterin-Glykoläthers ein. Die Menge des entwickelten Gases wurde quantitativ nach Van Slyke bestimmt, die entstandenen Stickoxyde durch zweimaliges Schütteln mit alkalischer Permanganatlösung absorbiert.

42 mg Rohprodukt: 4,6 ccm N (20,5° 719 mm)

41,3 mg Harnsäureäther: 0,9 ccm N (20,5° 719 mm)

Leerbestimmung: 0,7 ccm N (20,5° 719 mm)

Berechnet für eine NH_2-Gruppe

$C_7H_{11}O_5N_4$ (231) 6,06% N

Gef. 5,12% N

4. Spaltungsversuche.

Mit Salzsäure.

Etwa 50 mg der freien Base werden in etwa 5 ccm Wasser suspendiert und mit 5 ccm verdünnter Salzsäure versetzt, wobei sie sich klar lösen. Wird nun zum Sieden erhitzt, so tritt alsbald Kohlensäureentwicklung auf. Ein Luftstrom, der vorher durch Waschflaschen mit Kalilauge und Barytwasser gesaugt wird, treibt das entstehende Gas in ein mit Barytwasser beschicktes Péligotrohr über. Wenn bei Austausch des Absorptionsgefäßes gegen ein anderes keine Trübung mehr auftritt, wird unterbrochen, und die Kohlensäure des Bariumcarbonatniederschlages quantitativ bestimmt.

51,4 mg Sbst.: 20 ccm HCl (n=0,1) 14,6 ccm HaOH (n=0,1064)
9,83 mg CO_2

Ber. für Abspaltung von 1 CO_2
$C_7H_{11}O_5N_4$ (231) 19,05 % CO_2
Gef. 19,12 % CO_2

Die bei dieser Zersetzung im Kolben zurückbleibende Lösung gibt im Exsikkator eingedampft, einen Rückstand, der beim Übergießen mit Natronlauge Ammoniak entwickelt. Mit Äther läßt sich eine kristallisierte Substanz herausholen, die bei 98° unter Zersetzung schmilzt und in essigsaurer Lösung mit Calciumchlorid einen Niederschlag gibt, also Oxalsäure zu sein scheint. Absoluter Alkohol löst einen weiteren Teil, doch bleibt beim Eindampfen nur eine Schmiere zurück, die nicht zum Kristallisieren zu bringen ist. Der Rest ist wasserlöslich. Mit Silbernitrat ist Chlor nachzuweisen.

Kochende methylalkoholische Salzsäure gibt mit Leukopterinäther starke Kohlensäureentwicklung. Beim Eindampfen im Vakuum färbt sich die Lösung rötlich. Oxalsäure ist nicht nachzuweisen. Beim Anreiben mit Äther löst sich nichts, wohl aber mit absolutem Alkohol, doch ist der Rückstand nach dessen Verdampfung nicht zum Kristallisieren zu bringen oder zu identifizieren. Unlöslich bleibt wieder Ammonchlorid zurück.

Spaltung mit Alkali.

Zur Darstellung von Allantoin (nach den Angaben von Biltz für Harnsäure[5] werden 0,2 g Leukopterinäther kalt mit 2 ccm 2 — n Natronlauge versetzt. Nach dreistündigem Stehen wird von etwas ungelöstem Rückstand abfiltriert und mit Essigsäure angesäuert, worauf ein Niederschlag ausfällt. Bei kurzem Aufkochen ballt er sich zusammen und läßt sich dann gut filtrieren. Ausbeute 0,035 g. Durch Umfällen aus Soda-Salzsäure erhält man kugelige Aggregate. Die Analyse und sein sonstiges Verhalten stimmt auf Leukopterin.

3,749 mg Sbst. (Bei 100° im Vakuum getrocknet)
4,96 mg CO_2 1,05 mg H_2O
3,807 mg Sbst. 1,157 ccm N (22° 720 mm)
Leuk. $C_5H_5O_3N_4$ (169) Ber. C 35,49 H 2,98 N 33,16
Gef. 36,08 3,13 33,31

Das im Exsikkator eingedampfte Filtrat löst sich nicht mehr klar in Wasser. Mit Calciumchlorid in essigsaurer Lösung läßt sich Oxalsäure nachweisen. Der Rest trotzt allen Kristallisationsbemühungen.

Spaltung mit Wasser.

Beim Kochen mit Wasser zerfällt Harnsäureäther unter Bildung von Allantoin.[6] Aus 5 g Harnsäureäther wurden 2 g Allantoin gut kristallisiert erhalten. Erhitzt man Leukopterinäther unter den gleichen Bedingungen, so wird auch Kohlensäure abgespalten.

0,2924 g Leukopterinäther (freie Base) werden am Rückfluß zwei Stunden mit 10 ccm Wasser gekocht und durch einen Stickstoffstrom die entstehende Kohlensäure in eine mit Barytwasser beschickte Vorlage übergetrieben.

0,2924 g Sbst. 40 ccm HCl (n=0,1) 33,53 ccm NaOH (n=0,0615)
Berechnet für die Abspaltung von 1 CO_2
$C_7H_{11}O_5N_4$ (231) 19,05 % CO_2
Gef. 15,92 % CO_2

Das kohlensäurefreie Reaktionsgemisch läßt beim Filtrieren nur Spuren dunkler Verunreinigungen zurück. Das Filtrat ist wasserhell und wird im Exsikkator eingedampft. Man erhält so 0,2580 g eines

[5] Biltz B. 54, 2475 (1921).
[6] Biltz B. 54, 2465 (1921).

kristallinen Rückstandes, der aber uneinheitlich aussieht. Übergießen mit Natronlauge erzeugt deutlichen Ammoniakgeruch, Calciumchlorid in essigsaurer Lösung keinen Niederschlag. Mit Äther oder Alkohol läßt sich nichts herausholen, wohl aber durch Anreiben mit kaltem Wasser. Der größte Teil ist spielend darin löslich. Versetzt man die wässrige Lösung bis zur beginnenden Trübung mit Aceton und läßt sie stehen, so scheiden sich langsam sehr große schöne Kristalle in Rhombenform ab. Zersetzungspunkt: 208—210° unter Gelbfärbung. Bei etwa 110° verwittern sie. In methylalkoholischer Salzsäure sind sie leicht löslich und lassen sich mit Pyridin wieder fällen. Bei 15 Minuten langem Kochen mit verdünnter Salzsäure zersetzen sie sich und geben Oxalsäure.

Zur Analyse wurde bei 100° getrocknet.

3,402 mg Sbst. (Abnahme 0,6 %)
3,88 mg CO_2 1,68 mg H_2O
4,284 mg Sbst. 1,116 ccm N (24° 710 mm)
5,512 mg Sbst. 5,02 mg AgJ

$C_5H_{11}N_4O_4$ (191)	Ber.	C 31,41	H 5,76	N 29,32	OCH_3 16,23
	Gef.	31,11	5,53	27,98	12,03

Ungelöst sind 44 mg zurückgeblieben. Sie erweisen sich als uneinheitlich. Aus heißem Wasser erhält man Nadeln neben viereckigen Kristallen. Weder durch fraktioniertes Umkristallisieren noch durch Umfällen mit methylalkoholischer Salzsäure — Pyridin läßt sich das Gemisch trennen. Es hat keinen Schmelzpunkt. Allantoin ist nicht nachzuweisen.

0,2342 g Glykoläther-chlorhydrat werden in 10 ccm Wasser zwei Stunden zum Sieden erhitzt unter Durchsaugen eines Luftstromes und Auffangen der entstandenen Kohlensäure. Der Baryumcarbonatniederschlag wird in 20 ccm $^1/_{10}$—n Salzsäure gelöst. Zum Zurücktitrieren sind 2,4 ccm Natronlauge (n—0,0621) nötig.

Berechnet für die Abspaltung von 1 CO_2

$C_7H_{12}O_5N_4Cl$ (267,5)	Ber.	16,45 % CO_2
	Gef.	17,39 % CO_2

Die Lösung ist etwas trübe. Sie gibt beim Filtrieren 7 mg Rückstand, die sich wie unverändertes Ausgangsmaterial verhalten. Das Filtrat wird im Exsikkator eingedampft, wobei sich wieder Kristalle

abscheiden. Mit Wasser läßt sich keine Trennung herbeiführen. Alle Fraktionen sind uneinheitlich, ebenso geht es mit Alkohol. Mit Calciumchlorid ist Oxalsäure, beim Übergießen mit Natronlauge Ammoniak nachzuweisen. Größere Spaltstücke waren nicht zu fassen.

IX. Oxydationen:

1. mit Salpetersäure,
mit verdünnter Salpetersäure in der Wärme.

0,5 g Leukopterin werden in 5 ccm verdünnte Salpetersäure (1 Vol. Säure d 1,4 + 1 Vol. Wasser) eingetragen und im siedenden Wasserbad 20 Minuten erwärmt. Sie lösen sich sehr bald unter Entwicklung nitroser Gase. Von einigen unzersetzten Flocken wird abfiltriert und das Filtrat im Vakuum eingedampft. Beim Aufnehmen mit Wasser bleiben 42 mg Rückstand. Sie sind schwer löslich in organischen Lösungsmitteln, leicht löslich in Alkalien ohne Ammoniakentwicklung und haben keinen Schmelzpunkt. Mit Salpetersäure geben sie keine Murexidreaktion, auch bei längerem Erhitzen keine Oxalsäure. Sie lassen sich nicht aus Soda-Säure umfällen und am besten direkt aus verdünnten Säuren umkristallisieren. Man löst heiß in verdünnter Salzsäure. Beim Erkalten erscheinen, wenn man vorsichtig genug arbeitet, Nädelchen, die zu runden Konglomeraten verfilzt sind. Kühlt man zu schnell, so erhält man nur große gelbe Kugeln. Zur Analyse wurde bei 150° im Vakuum getrocknet.

3,270 mg Sbst. 3,68 mg CO_2 1,21 mg H_2O 0,011 mg Rückst.
3,093 mg Sbst. 0,785 ccm N (21° 706 mm)
2,314 mg Sbst. 2,47 mg CO_2 0,83 mg H_2O 0,043 mg Rückst.

$C_5H_9N_4O_5$ (205)	Ber.	C 29,27	H 4,39	N 27,32
	Gef.	30,69	4,14	27,38
		29,11	4,01	

Das wässrige Filtrat hinterläßt, im Exsikkator eingedampft, einen Rückstand, der mit absolutem Alkohol ausgekocht wird. Ungelöst bleiben dabei 32 mg. Sie sind in Wasser leicht löslich, beim Einengen kristallisieren lange Nadeln vom Zersetzungspunkt 220°. Beim Übergießen mit Natronlauge läßt sich Ammoniak, mit Calciumchlorid in essigsaurer Lösung Oxalsäure nachweisen. (Ammoniumoxalat zersetzt sich bei 224°.)

Der in den Alkohol gegangene Teil wird im Vakuum vom Alkohol befreit, mit verdünnter Salzsäure aufgenommen und im Extraktionsapparätchen erschöpfend ausgeäthert. Es werden so etwa 100 mg einer gut kristallisierenden Substanz isoliert, vom Schmelzpunkt 98°, die mit Calciumchlorid in essigsaurer Lösung einen starken Niederschlag gibt und Permanganat entfärbt. Rechnet man die Oxalsäure aus dem Ammoniumoxalat hinzu, so sind es im ganzen etwa 120 mg—90 % der Theorie.

Der Rückstand von der Ätherextraktion sieht gelblich aus und rötet sich beim Stehenlassen im Exsikkator allmählich. Er ist schmierig und wird auch beim Anreiben mit Lösungsmitteln nicht besser. Es ließ sich nichts weiter isolieren.

Eine neue Oxalsäurebestimmung wird wie folgt ausgeführt. Man oxydiert 0,2 g Leukopterin wie oben angegeben, nimmt dann den in Wasser löslichen Teil aber nach dem Eindampfen mit Aceton auf, wobei die Hauptmenge körnig und gut filtrierbar zurückbleibt. Sie löst sich glatt in Wasser und gibt in essigsaurer Lösung mit Calciumchlorid einen starken Niederschlag, der nach dem Absitzenlassen filtriert wird. Es sind 93 mg, das ist 20 % mehr als die Theorie fordert. Eine Calciumbestimmung gibt 29 statt 31,2 % Ca.

Zur Kohlensäurebestimmung werden 0,1 g Leukopterin in 5 ccm Wasser suspendiert und mit 4 ccm Salpetersäure (1 Vol. Säure d. 1,4 + 3 Vol. Wasser) bei Wasserbadtemperatur oxydiert. Die entstehende Kohlensäure wird durch einen Luftstrom in die mit Barytwasser beschickte Vorlage übergetrieben und im Bariumcarbonatniederschlag quantitativ bestimmt

0,1 g Sbst. 20 ccm HCl (n=0,1204) 13,0 ccm NaOH (n=0,1005)
24,23 mg CO_2

Harnsäure ebenso behandelt gibt:

0,1 g Sbst. 20 ccm HCl (n=0,1204) 12,5 ccm NaOH (n=0,1005)
25,35 mg CO_2

$C_5H_5O_3N_4$ (169) Ber. 26,04 % CO_2 Gef. 24,23 %
$C_5H_4O_3N_4$ (168) Ber. 26,19 % CO_2 Gef. 25,35 %

Berechnet für die Abspaltung von 1 CO_2.

Oxydation mit konz. Salpetersäure in der Kälte.[7]

0,3 g Leukopterin werden langsam in 0,6 g Salpetersäure (d 1,48) eingetragen, wobei man jedesmal mit dem Zugeben wartet, bis die lebhaft einsetzende Reaktion zu Ende ist. Sie lösen sich anfangs vollkommen, später fällt ein gelber Körper aus. Ist alles eingetragen, so spült man das Reaktionsgemisch mit Wasser in eine Kristallisierschale und dampft über Kalilauge und Schwefelsäure im Exsikkator ein. Der Rückstand wird noch dreimal mit Wasser aufgenommen und zur Trockne verdampft. Er bleibt schmierig und stark hygroskopisch. Mit Quarz verrieben läßt er sich in eine Extraktionshülse bringen und mit absolutem Äther erschöpfend extrahieren. Es werden so 37 mg herausgeholt, deren wässrige Lösung, wohl infolge von mitextrahierter Salpetersäure kongosauer reagiert und mit Natriumacetat und Calciumchlorid 27 mg Calciumoxalat gibt —20 % der Theorie. Der in der Hülse zurückgebliebene Teil wird mehrmals kalt mit Wasser angerieben und das Filtrat mit einer salzsauren Lösung von Zinnchlorür versetzt, um etwa entstandenes Alloxan als Alloxanthin zu isolieren. Es entsteht sofort eine Trübung. Nach dem Abfiltrieren und Trocknen bleiben nur 5 mg übrig, die sich oberhalb 200° ohne Rötung langsam zersetzen und nicht als Alloxanthin identifizieren lassen. Bei längerem Stehenlassen oder Einengen kommt keine Fällung mehr. Die Hauptmenge scheint noch im Rückstand zu stecken. Durch mehrfaches Auskochen mit Wasser erhält man daraus einen gelben Körper, der sich beim Umkristallisieren und durch die Analyse als der schon von der Oxydation mit verdünnter Salpetersäure her bekannte erweist.

3,583 mg Sbst. (keine Abnahme beim Trocknen bei 150° im Vakuum)
0,946 ccm N (25° 713 mm)

4,084 mg Sbst. 4,33 mg CO_2 1,54 mg H_2O 0,023 mg Rückst.

$C_5H_9N_4O_5$ (205) Ber. C 29,27 H 4,39 N 27,32
Gef. 29,08 4,24 28,36

Weiter war nichts zu isolieren.

Aus Harnsäure erhält man, wenn man unter den gleichen Bedingungen oxydiert, keinen äther-löslichen Körper, wohl aber Alloxan, das sich mit salzsaurer Zinnchlorürlösung reduzieren und als Alloxanthin

[7] Liebig und Wöhler A. 26, 241 (1838).

isolieren läßt. 0,335 g Harnsäure geben 0,191 mg Alloxanthin — 67 % der Theorie.

2. Oxydation mit Kaliumpermanganat.

Leukopterin wird nach der Methode von Sundwick[8] mit Permanganat oxydiert und mit Harnsäure verglichen. Zur natron-alkalischen Lösung wird etwas mehr als die berechnete Menge Kaliumpermanganat in konzentrierter wässriger Lösung kalt zugegeben und dann sofort mit Essigsäure angesäuert. Die Bestimmung der dabei auftretenden Kohlensäure ergibt für Harnsäure

0,0999 g Sbst. 20 ccm HCl (n—0,1204) 14,4 ccm NaOH (n=0,1000
0,1000 g Sbst. 20 ccm HCl (n—0,1204) 15,7 ccm NaOH
0,1004 g Sbst. 20 ccm HCl (n—0,1204) 14,8 ccm NaOH

für Leukopterin:

0,1001 g Sbst. 20 ccm HCl (n—0,1204) 16,2 ccm NaOH (n=0,1000
0,0996 g Sbst. 20 ccm HCl (n—0,1204) 16,9 ccm NaOH

Berechnet für die Abspaltung von 1 CO_2:

$C_5H_5O_3N_4$ (169) Ber. 26,04 % CO_2 Gef. 17,31 15,85
$C_5H_4O_3N_4$ (168) Ber. 26,19 % CO_2 Gef. 21,29 18,44
20,3 %

Nach dem Abfiltrieren vom Braunstein werden die Lösungen auf dem Wasserbad eingedampft, wobei von beiden ein schmieriger Rückstand zurückbleibt. Während aber aus dem der Harnsäure 50—60 % der theoretischen Menge an Allantoin durch Zerreiben mit wenig Wasser erhalten werden kann, löst sich der Leukopterin-Rückstand dabei fast ganz. Es bleiben nur wenige Milligramme zurück. Sie haben keinen Schmelzpunkt und geben aus verdünnten Säuren oder viel Wasser dieselben gelben Kugeln, wie sie bei der Salpetersäure-Oxydation in größerer Menge erhalten werden. In dem wässrigen Filtrat ist Oxalsäure nachzuweisen, die bei Harnsäure nicht gefunden wurde, aber nur in geringer Menge. Nach dem Eindampfen bleibt ein Rückstand, der stark hygroskopisch ist und sich nicht weiter identifizieren ließ.

Ein Versuch, vor dem Einengen mit Schwefelsäure statt mit Essigsäure anzusäuern, schlug, obgleich die Lösung nur ganz schwach kongosauer war, fehl. Es wurde zwar etwa die gleiche Menge Kohlen-

[8] H. S. 41, 343 (1904).

säure aber auch aus Harnsäure gar kein Allantoin isoliert. Leukopterin gibt etwa 13,6 mg (aus 100 mg Substanz) des gelben in Kugeln kristallisierenden Körpers.

3. Oxydation mit Jod. [9]

0,0510 g Harnsäure und 0,0500 g Leukopterin werden in je 5 ccm 2—n Natronlauge heiß gelöst. Nach dem Erkalten werden je 20 ccm einer n/10-Jodlösung zugegeben, nach drei Minuten angesäuert und nach einer Stunde unter Zusatz von Stärkelösung mit n/10-Thiosulfat das unverbrauchte Jod zurücktitriert.

$C_5H_4O_3N_4$ (168) 8,4 ccm $Na_2S_2O_3$ 3,8 Atome Jod
$C_5H_5O_3N_4$ (169) 9,5 ccm $Na_2S_2O_3$ 3,55 Atome Jod

Beim Ansäuern ist die Harnsäurelösung klar geblieben, aus der Leukopterinlösung kommt ein wenig Niederschlag, der sich wie unverändertes Ausgangsmaterial verhält.

4. Oxydation mit Chlor:

in Wasser.

Leukopterin in Wasser suspendiert, löst sich beim Einleiten von Chlor zum Teil. Am Boden bleibt ein gelber Körper liegen, der in Wasser und Säuren unlöslich ist. Beim Abfiltrieren verschmiert er. Das Filtrat hinterläßt, im Exsikkator eingedunstet, eine Schmiere.

Harnsäure löst sich unter gleichen Bedingungen ganz. Der im Exsikkator zurückbleibende schmierige Rückstand färbt sich allmählich rötlich.

in Eisessig.

Die Oxydation der Harnsäure mit Chlor und Eisessig nach Biltz[10] gelingt gut, auch bei kleinen Mengen. Es wurden aus 0,5 g Harnsäure 0,2 g Alloxan erhalten, die sich mit Schwefelwasserstoff oder Zinnchlorür glatt zu Alloxanthin reduzieren lassen. Ein Versuch, gleich Alloxanthin darzustellen, ohne erst Alloxan zu isolieren, schlug fehl. Gießt man das Chlorierungsgemisch direkt in Äther, reibt das sich dabei ausscheidende schmierige Reaktionsprodukt ein paar Mal mit Äther an und nimmt es dann mit Wasser auf, so ist aus der wässrigen

[9] Fürth B. Z. 159, 136 (1925).
[10] Biltz A. 413, 61 (1917).

Lösung weder mit Schwefelwasserstoff noch mit Stannochlorid Alloxanthin zu erhalten.

0,2 g Leukopterin werden unter gleichen Bedingungen chloriert. Sie lösen sich dabei glatt mit bräunlicher Farbe. Beim Eingießen in Äther entsteht eine braune Schmiere, die auch durch mehrfaches Anreiben mit Äther nicht besser wird. Mit Aceton gibt sie ein körniges und filtrierbares Produkt 0,13 g. Nach längerem Stehen kommen aus dem Aceton 8 mg weiße Nadeln, die zu Sternchen angeordnet sind. Fp. 200° unter Zersetzung und Gelbfärbung. Die Hauptmenge ist stark gefärbt und deutlich uneinheitlich. Sie zersetzt sich bei etwa 192° unter Aufschäumen. In Wasser und Methylalkohol ist sie leicht, in Aceton und Äther unlöslich. Aus Gemischen von beiden wurden nur Flocken erhalten. Mit Silbernitrat entsteht auch nach mehrfachem Reinigen ein Niederschlag. Mit Pyridin läßt sich aus der methylalkoholischen Lösung nichts fällen, mit Natronlauge kein Ammoniak, mit Calciumchlorid etwas Oxalsäure nachweisen. Beim Umkristallisieren aus Wasser erhält man ein uneinheitliches Gemisch, das sich nicht trennen läßt.

5. Oxydation mit Wasserstoffperoxyd:

in saurer Lösung.[11]

0,1 g Leukopterin lösen sich auch bei stundenlangem Kochen mit 3 ccm Wasserstoffperoxyd (3%ig) und 0,5 ccm 2—n Salzsäure nicht völlig. Das Gemisch schäumt sehr stark. Der Rückstand gibt alle Reaktionen unveränderten Leukopterins, das Filtrat neben Oxalsäure den schon von der Salpetersäureoxydation her bekannten gelben Körper.

Harnsäure geht unter gleichen Bedingungen völlig in Lösung. Neben Parabansäure läßt sich auch Oxalsäure nachweisen.

in alkalischer Lösung.[12]

Versetzt man eine alkalische Lösung von Leukopterin mit 3%igem Wasserstoffperoxyd, so fällt Leukopterin sehr leicht aus. In Kalilauge ist es gar nicht in Lösung zu halten; auch aus der natron-alkalischen Lösung erhält man nach 72stündigem Stehenlassen nur Ausgangsmaterial.

---

[11] Biltz B. 59, 721 (1926).

[12] Walters-Wise, Am. Chem. Soc. 39, 1750 (1917).

Harnsäure wird unter gleichen Bedingungen oxydiert. Die Murexidprobe fällt bei den sich dabei ausscheidenden Kristallen negativ aus.

X. Reduktionsversuche:

1. mit Zinkstaub.

Leukopterin wird in alkalischer Lösung eine halbe Stunde mit Zinkstaub gekocht; nach dem Abfiltrieren und Ansäuern erhält man das Ausgangsmaterial zurück.

2. mit Jodwasserstoffsäure.

0,1 g Leukopterin werden mit 1 ccm Jodwasserstoffsäure (d 1,9) unter Zusatz von etwas rotem Phosphor zwei Stunden am Rückfluß gekocht, das Reaktionsgemisch dann mit Wasser verdünnt und filtriert. Das Filtrat läßt, auf dem Wasserbad eingeengt, ein wenig Schmiere zurück. Der abfiltrierte Phosphor wird mit verdünnter Natronlauge ein paar Mal angerieben. Die vereinigten Lösungen geben beim Ansäuern unverändertes Leukopterin.

XI. Spaltungsversuche.

Eine Lösung von Leukopterin in der zur Bildung des Di-Natriumsalzes nötigen Menge Natronlauge wird zur Trockne verdampft, der Rückstand im Vakuum bei 120—130° getrocknet. Da keine Veränderung eintritt, erhitzt man weiter bis 310°. Jetzt setzt teilweise Verkohlung ein. Mit Natronlauge läßt sich aber nach dem Abkühlen die Hauptmenge noch als unverändertes Leukopterin herauslösen.

Leukopterin, acht Stunden mit 5—n Natronlauge gekocht, bleibt unverändert.

Leukopterin, acht Stunden mit konzentrierter Salzsäure am Rückfluß gekocht, gibt nur Ausgangsmaterial zurück.

Erhitzt man Leukopterin im Einschlußrohr mit konzentrierter Salzsäure auf 150°, so tritt noch keine deutliche Veränderung ein, sie wird erst sichtbar, wenn man bis auf 180—200° geht. Beim Öffnen ist starker Druck im Rohr. Der Inhalt löst sich vollkommen in Wasser. Außer Ammonchlorid und Kohle ist nichts nachzuweisen.

XII. Methylierungsversuche:

1. mit Diazomethan.

Ein Versuch, die bei dem Einleiten von Kohlensäure in die sodaalkalische Lösung der Harnsäure durch hydrolytische Spaltung des Mono-Natriumsalzes frei werdende Harnsäure im Entstehungszustand direkt zu methylieren, schlug fehl. Diazomethan wird zu gleicher Zeit mit einem Kohlensäurestrom in eine klare Lösung von Harnsäure in Soda eingeleitet, die mit Chloroform unterschichtet ist. Das Chloroform färbt sich dabei gelb, hinterläßt aber beim Abdampfen keinen Rückstand. Aus der wässrigen Schicht sind nur typische Harnsäurekristalle zu isolieren.

0,1 g Leukopterin wird möglichst fein verrieben, mit 10 ccm ätherischer Diazomethanlösung (1,2%ig) versetzt. Deutliche Blasenentwicklung ist dabei nicht zu erkennen. Am nächsten Tag wird der Äther verdunstet, der Rückstand von neuem gepulvert, noch einmal mit Diazomethan behandelt und am dritten Tag dasselbe noch einmal wiederholt. Dann wird der Äther verdampft und der Rückstand mit heißem Chloroform ausgezogen. Es sind dabei nur etwa 10 mg in Lösung gegangen, die beim Eindunsten als Schmiere zurückbleiben. In warmem absolutem Alkohol sind sie löslich, konnten aber nicht zum Kristallisieren gebracht werden.

2. mit Dimethylsulfat.

Die Methylierung der Harnsäure mit Dimethylsulfat im Einschlußrohr[13] gibt bei Verwendung von 0,14 g Dikaliumsalz nach dem Ansäuern mit Salzsäure und Eindampfen nur eine braune Schmiere.

Wird 0,1 g Leukopterin mit 0,5 ccm Dimethylsulfat, 1,5 ccm 1,5—n Natronlauge und etwas Eis eineinhalb Stunden auf der Maschine geschüttelt, so gibt es beim Ansäuern keinen Niederschlag mehr. Fast bis zur Trockne verdampft, scheidet die Lösung ein paar Flocken aus. Das Filtrat hinterläßt nur eine Schmiere. Ein primär entstandenes Methylierungsprodukt scheint durch das starke Alkali weitgehendst zersetzt zu sein. Auch methylierte Harnsäuren sind gegen Alkali empfindlich.[14]

[13] Biltz A. 423, 259 (1921).

[14] E. Fischer B. 17, 1776 (1884).

XIII. Untersuchung der Schmetterlings-Exkremente.

480 Puppen von Pieris brassicae werden kurz vor dem Schlüpfen in mit Filtrierpapier ausgelegte Kästen gebracht. Die Schmetterlinge hinterlassen bald nach dem Auskriechen ein bräunliches Exkret, das von dem Papier aufgesogen wird. Sie werden gleich darauf mit Äther getötet.

Zur Entfernung von einigen Verunreinigungen wird die gesamte Filtrierpapiermasse erschöpfend mit Alkohol extrahiert. Es löst sich dabei ein Teil, der als gelbliche, fast ganz in Wasser unlösliche Schmiere beim Eindunsten zurückbleibt. Harnstoff läßt sich darin als Nitrat mit Salpetersäure nicht nachweisen.

Der Inhalt des Extraktionsapparates wird nach dem Trocknen zweimal mit verdünntem Ammoniak (etwa n/2) ausgezogen. Die Filtrate, die die Farbe der unreinen Leukopterin-extrakte zeigen, hinterlassen, auf dem Wasserbad eingedampft, einen dunkelbraunen Rückstand. Er löst sich in Natronlauge. Mit Salzsäure lassen sich 0,2 g einer flockigen, amorphen Substanz fällen. Beim Umkristallisieren aus Soda-Salzsäure erscheint auch in sehr verdünnter Lösung sofort ein Niederschlag. Filtriert man ihn ab, so erhält man eine klare Lösung, die bei längerem Stehen, manchmal auch erst beim Einengen, schöne stäbchenförmige oder sechseckige Kristalle gibt. 120 mg.

Zur Analyse wird noch einmal aus Soda-Salzsäure unter Zusatz von etwas Tierkohle umgefällt; die erhaltenen schwach bräunlichen Kristalle werden im Vakuum bei 150° getrocknet.

4,117 mg Sbst. (keine Abnahme beim Trocknen)

5,39 mg CO_2 0,76 mg H_2O

$C_5H_4O_3N_4$ (168) Ber. C 35,76 H 2,40

$C_5H_5O_3N_4$ (169) Ber. C 35,49 H 2,98

Gef. 35,71 2,07

Eine heiß gesättigte Lösung des Körpers in 1—n Soda gibt beim Abkühlen die typischen langen Nadeln des Natriumsalzes der Harnsäure, die weiß gefärbt sind.

Lebenslauf.

Am 18. April 1902 wurde ich, Margarete Anna Christine Bülow, als Tochter des Betriebsinspektors der Zuckerfabrik, Dr. Karl Bülow, in Anklam in Pommern geboren. Ich besuchte von Ostern 1908—1918 die höhere Mädchenschule in Waren in Mecklenburg, wohin mein Vater als Direktor der Zuckerfabrik berufen war, trat dann in die Obersekunda der Studienanstalt in Schwerin ein (realgymnasiale Kurse) und verließ die Schule Ostern 1921 mit dem Zeugnis der Reife. Nach einjähriger Unterbrechung begann ich im Sommersemester 1922 an der Universität Göttingen mit dem Studium der Chemie und setzte es ab Herbst 1923 in Freiburg im Breisgau fort. Hier legte ich die erste und die zweite Verbandsprüfung ab und ging dann nach München, wo ich ab Ostern 1926 meine Promotionsarbeit anfertigte.